

PCT/EP2004/002911

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

20. 07. 2004

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'L 06 SEP 2004

WIPO PCT

### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

103 13 791.2

**Anmeldetag:**

20. März 2003

**Anmelder/Inhaber:**

Dr. Franz-Christoph B a n g e,  
30171 Hannover/DE

**Bezeichnung:**

Spezifischer Nachweis von Mykobakterien  
des M. tuberculosis-Komplex

**IPC:**

C 07 H, C 12 Q

BEST AVAILABLE COPY

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 01. Juli 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

# Gleiss & Große

Patentanwälte · Rechtsanwälte  
European Patent Attorneys  
European Trademark Attorneys

Intellectual Property Law  
Technology Law

Leitzstraße 45  
D-70469 Stuttgart  
Telefon: +49 (0)711 99 3 11-0  
Telefax: +49 (0)711 99 3 11-200  
E-Mail: [office@gleiss-grosse.com](mailto:office@gleiss-grosse.com)  
Homepage: [www.gleiss-grosse.com](http://www.gleiss-grosse.com)

Dr. jur. Alf-Olav Gleiss · Dipl.-Ing. · PA  
Rainer Große · Dipl.-Ing. · PA  
Dr. Andreas Schrell · Dipl.-Biol. · PA  
Torsten Armin Krüger · RA  
Nils Heide · RA  
Armin Eugen Stockinger · RA  
Georg Brisch · Dipl.-Ing. · PA  
Erik Graf v. Baudissin · RA

PA: Patentanwalt · European Patent Attorney  
European Trademark Attorney  
RA: Rechtsanwalt · Attorney-at-law · Admitted for  
Representation at the EU-Trademark Office (OHIM), Alicante

In cooperation with  
Shanghai Zhi Xin Patent Agency Ltd.  
Shanghai · China

## Patentanmeldung

---

**Spezifischer Nachweis von Mykobakterien des *M. tuberculosis*-Komplex**

---

**Dr. Franz-Christoph Bange  
Krausenstraße 39 A**

**30171 HANNOVER**

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zum spezifischen Nachweis von Mykobakterieninfektionen mit Mykobakterienarten der Gruppe *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (TBC), das  
5 heißt *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), *Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis* BCG), *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*) und *Mycobacterium microti* (*M. microti*), in klinischem Material.

Gegenwärtig sind cirka 2 Milliarden Menschen weltweit mit dem Erreger der Tuberkulose, *M. tuberculosis*, infiziert, wobei jährlich 8 Millionen an Tuberkulose erkranken. Von den an Tuberkulose erkrankten versterben jährlich 3 Millionen. Damit ist die Tuberkulose weltweit zur Zeit die am häufigsten zum Tode führende bakterielle Infektions-  
10 erkrankung. In den meisten Industrienationen besteht aufgrund der Gefährlichkeit dieser Erkrankung eine sofortige Meldepflicht nach Diagnose einer Tuberkulose, nicht zuletzt um so schnell wie möglich eine Ausbreitung in der Bevölkerung zu verhindern. In Westeuropa liegt die durchschnittliche Inzidenz bei cirka 30 jährlichen Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner, in der Bundesrepublik Deutschland  
15 bei cirka 20. Die Tuberkulose ist hauptsächlich in der Lunge lokalisiert (mehr als 80% der Tuberkulosefälle in Deutschland), seltener in Halslymphknoten, Darm oder Haut. Die sehr unterschiedlichen klinischen Verläufe der Tuberkulose machen eine exakte Beschreibung des Krankheitszustandes sowie eine schnelle Diagnose insbesondere zur frühen Erkennung früher Erkrankungsstadien notwendig.  
20  
25

In den letzten Jahren kann ein vermehrtes Auftreten von Tuberkulose sowohl in den Entwicklungsländern als auch in den Industrienati-

onen beobachtet werden, wobei vor allem bei immunsupprimierten HIV-Patienten dadurch regelmäßig Todesfälle verzeichnet werden. Jedoch nicht nur wegen der allgemeinen Gefahr für große Teile der Weltbevölkerung, sondern auch wegen des inzwischen epidemieartigen Auftretens von mehrfach-resistenten Bakterienstämmen (MDRTB) innerhalb oder außerhalb von Krankenhäusern wird die schnelle und eindeutige Diagnose zum Nachweis dieser Tuberkulose-auslösenden Bakterienstämme gefordert. Ziel der gegenwärtigen Bemühungen auf dem Gebiet der Mykobakterien-Diagnostik ist daher nicht allein die Bereitstellung von Mykobakterien-Tests, welche es erlauben, eine Mykobakterieninfektion innerhalb kürzester Zeit in einem frühen Infektionsstadium zu erkennen, sondern vielmehr die Tuberkulose-auslösenden Erregerstämme spezifisch zu identifizieren, beispielsweise den spezifischen Nachweis von tuberkulösen Mykobakterien des TBC gegenüber nicht-tuberkulösen Mykobakterien sowie die Unterscheidung einzelner Spezies innerhalb des TBC.

In den letzten Jahren wurden zur klinischen Diagnose von Mykobakterien im Labor verstärkt auch molekularbiologische Techniken, insbesondere basierend auf der DNA-Amplifikation wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Telenti *et al.* beschreiben dabei einen Mykobakterien-Test zur spezifischen Detektion einiger Mykobakterienspezies mittels PCR und Restriktionsenzymanalyse (Telenti *et al.*, J. Clin. Microbiol. (1993) 31:175-178).

Darüber hinaus existieren gattungsspezifische Verfahren für Mykobakterien, um Mykobakterieninfektionen gegenüber Infektionen mit nicht-Mykobakterien-Erregern abzugrenzen. Bekannte gattungsspezifische Verfahren zielen dabei auf das Gen codierend die 16S-rRNA, das heißt das 16S-rRNA-Gen, oder das Gen des 65 kDa-

„heat shock“-Proteins. Zu den Genomregionen, die bekanntermaßen zum artspezifischen Nachweis von einigen Erregern des TBC mittels PCR eingesetzt werden können, zählen beispielsweise die Region IS6110, die Gene des 38 kDa-Proteins, die Gene des MBP64-Proteins oder die Regionen mtp40 oder pMTb4.

Abgesehen von diesen individuellen Laborverfahren existieren auch kommerziell erhältliche Diagnose-Kits, die meist ausschließlich zur Diagnose der Erregergruppe des TBC geeignet sind. Bekannte Kits werden beispielsweise von Roche-Amplicor™, Geneprobe™ oder Abbot™ angeboten. Bezeichnend für die heutige Situation ist die Tatsache, dass es bis jetzt noch keine Methode gibt, die als allgemein anerkannter Diagnosestandard akzeptiert ist. Weitere bekannte Nachteile kommerziell erhältlicher Verfahren sind die mögliche und spezifische Inhibition der Amplifikationsreaktion bei manchen klinischen Proben, eine lange Untersuchungsdauer - in jedem Fall über mehrere Stunden, meist aber über Nacht - sowie die Einschränkung auf bestimmte klinische Untersuchungsmaterialien, insbesondere auf Proben aus dem Respirationstrakt.

Es existieren auch Ansätze zur Unterscheidung und zum spezifischen Nachweis einzelner Mykobakterienarten, welche der Gruppe des TBC angehören (z.B. Sreevatsan *et al.* J. Clin. Microbiol. (1996) 34:2007-2010). Die Identifikation einer polymorphen Region im *oxyR-Gen* von Mykobakterien, welche für die Spezies *M. bovis* und den abgeschwächten Tuberkulose-Impfstamm *M. bovis* BCG (*Bacillus Calmette Guérin*), das heißt für bovine Mykobakterien spezifisch ist. So besaßen die untersuchten Isolate von *M. bovis* und *M. bovis* BCG an Position 285 des *oxyR*-Gens die Base Adenin, während die anderen Mitglieder des TBC an dieser Stelle eine Guanin-Base auf-

wiesen. In einer Untersuchung von Talbot *et al.* (J. Clin. Microbiol. (1997) 35:566-569) konnte *M. bovis* BCG anhand der in diesem Stamm spezifisch fehlenden Genomregion RD1 („region of difference“) in einer Multiplex-PCR nachgewiesen werden.

- 5 Diese Verfahren zum spezifischen Nachweis einzelner Stämme der Gruppe des TBC weisen jedoch insbesondere den Nachteil auf, dass sie in der klinischen Routinediagnostik aufgrund der komplizierten und langwierigen Vorgehensweise, insbesondere in mehreren Schritten, wenig geeignet sind. So müssen nach erfolgter Amplifikation der
- 10 isolierten Proben-DNA die amplifizierten Fragmente in aufwändigen Hybridisierungsverfahren, durch Sequenzierung oder in ähnlich aufwändige Verfahren analysiert werden. Diese Nachweisverfahren erfordern darüber hinaus normalerweise den Einsatz hochqualifizierter Personen. Außerdem müssen diese Nachweisverfahren meist mindestens
- 15 über Nacht angesetzt werden; ein Ergebnis steht also frühestens am nächsten Tag nach Probenbereitstellung zur Verfügung. Patienten müssen bis zum Vorliegen der Untersuchungsergebnisse meist stationär aufgenommen werden.

- 20 Andere Verfahren enthalten zur Unterscheidung und zum spezifischen Nachweis der Gattung *Mycobacterium* die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien. Damit lässt sich ein Nachweis erbringen, ob Erregerstämme des TBC, nicht-tuberkulöse Mykobakterien oder Erregerstämme, die nicht zu den Mykobakterien zählen, vorliegen. Die deutsche Patentanmeldung DE 102 15 238.1 betreffend die molekulare Diagnostik von Mykobakterien insbesondere den
- 25 gemeinsamen und jeweils spezifischen Nachweis einer Mykobakterieninfektion mit Erregern des TBC, insbesondere *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG, gegenüber nicht-tuberkulösen Mykobakte-

- rien, beispielsweise *M. avium*, *M. paratuberculosis* oder *M. intracellulare*, und/oder nicht-Mykobakterien, beispielsweise nicht-mykobakterielle Actinomyceten, Erreger der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Enterococcus* sowie *Proteus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* oder *Pseudomonas* oder pilzliche Erreger, in klinischem Material wird hiermit mit ihrem gesamten Inhalt in diese Beschreibung eingeschlossen. Eine Unterscheidung von Erregerstämmen innerhalb der TBC ist mit Hilfe des 16S-rRNA-Gens nicht möglich.
- 5
- 10 Eine Differenzierung einzelner Erregerstämmen innerhalb des TBC, insbesondere die Identifikation von *M. tuberculosis* kann normalerweise nur durch Testen der Nitratreduktase-Aktivität der Mykobakterien erfolgen (z.B. Metchock B.G. *et al.* In: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington DC, 1999: 399-437). Es ist be-
- 15 kannt, dass die Nitratreduktase-Aktivität von Erregerstämmen der Art *M. tuberculosis* gegenüber der Nitratreduktase-Aktivität der anderen Mykobakterienstämmen von TBC erheblich erhöht ist. Um den Nitratreduktase-Test durchzuführen, ist aber vor allem die Kultivierung der aus dem klinischen Material isolierten Mykobakterienstämmen, insbesondere also tuberkulöser Erregerstämmen im Labor erforderlich, was normalerweise allein in speziell für die Kultivierung hochinfektiöser Erreger ausgestatteten Labors möglich ist. Die Verfügbarkeit solcher Tests in der klinischen Routinediagnostik ist daher mit einem hohen labortechnischen und finanziellen Aufwand verbunden.
- 20
- 25

Alle bisher bestehenden Nachweismethoden werden als unbefriedigend und deshalb verbesserungswürdig angesehen. Aus dem Stand der Technik ist bisher kein für den klinischen Routineeinsatz geeig-

netes Verfahren bekannt, das sich insbesondere durch einfache Anwendung auszeichnet und womit es gelänge, die Mitglieder der Gruppe TBC spezifisch in klinischem Material wie Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Knochenmark, Blut oder in Biopsien nachzuweisen.

Es ist bekannt, dass der Einsatz der Echtzeit-PCR („Rapid-Cycle-PCR“), die beispielsweise mit einem lufttemperierten System ausgestattet ist und somit wesentlich geringere Transitionszeiten gegenüber einer herkömmlichen PCR aufweist, zu einer deutlich verminderten Zeit bis zum Nachweis von beispielsweise Mykobakterien mittels Amplifikation des isolierten genetischen Materials der Mykobakterien führt (Chapin und Lauderdale, J. Clin. Microbiol. (1997) 35:2157-2159). Darüber hinaus stellen fluorimetrische Messungen bei der Anwendung farbmarkierter Hybridisierungssonden, insbesondere im Rahmen der Echtzeit-PCR, eine schnelle und empfindliche Methode zum Nachweis amplifizierter Genfragmente dar.

Vor diesem Hintergrund liegt das technische Problem der vorliegenden Erfindung darin, insbesondere verbesserte Verfahren und Mittel dazu bereitzustellen, welche im Wesentlichen einen besonders schnellen und gleichzeitig spezifischeren Nachweis von Mykobakterieninfektionen und die Identifizierung von Bakterienarten der Gruppe des *M. tuberculosis*-Komplex (TBC) in klinischem Material verschiedenen Ursprungs ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung löst das technische Problem einerseits durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* in klinischem Material, wobei im Wesentlichen



in einem Schritt a) mikrobielle DNA aus klinischem Material extrahiert wird, in einem weiteren Schritt d) mindestens ein DNA-Fragment des Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien, das heißt des *narGHJI*-Operons, welches Nitratreduktase codiert, aus der extrahierten DNA amplifiziert wird, wobei das mindestens eine amplifizierte DNA-Fragment eine Zielregion beinhaltet, welche mindestens einen DNA-Polymorphismus spezifisch für *M. tuberculosis* aufweist, und

in einem weiteren Schritt e) die spezifische Hybridisierung des mindestens einen amplifizierten DNA-Fragments mit mindestens einer Hybridisierungssonde, das heißt Oligonucleotid, detektiert wird, wobei die mindestens eine Hybridisierungssonde die Nucleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 9, der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 9, der Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 10 und der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 10, enthält, insbesondere daraus besteht, und wobei der spezifische Nachweis von *M. tuberculosis* gegenüber anderen Mitgliedern des TBC, das heißt *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* und *M. microti*, mittels Analyse der Schmelztemperatur der spezifischen Hybridisierung der mindestens einen Hybridisierungssonde mit dem amplifizierten DNA-Fragment des *narGHJI*-Operons, das heißt mittels Schmelzkurvenanalyse, erfolgt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist der mindestens eine *M. tuberculosis*-spezifische DNA-Polymorphismus des *narGHJI*-Operons an Position -215 in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Operons, das heißt in der Promotorregion, im Folgenden als *narGHJI*-Promotor bezeichnet, lokalisiert.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird im vorgenannten Schritt e) zur Amplifikation des DNA-Fragments des *narGHJI*-Operons, mindestens ein Primer, insbesondere mindestens ein Primerpaar, eingesetzt, wobei die Primer Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 6 und/oder die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 7 enthalten, insbesondere daraus bestehen. Erfindungsgemäß bevorzugt enthält das in Schritt e) zur spezifischen Hybridisierung des amplifizierten DNA-Fragments bevorzugt eingesetzte mindestens eine Paar markierter Hybridisierungssonden Nucleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe der Nucleotidsequenzenpaare der Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 8 und in SEQ ID NO: 9, dem Paar der komplementären Sequenzen von SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 9, der Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 8 und in SEQ ID NO: 10 und dem Paar der komplementären Sequenzen von SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 10, insbesondere besteht es daraus.

Die Erfinder fanden überraschend, dass am der Stelle des 215ten Nucleotids in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Operons, das heißt an Position -215 des *narGHJI*-Promotors, bei *M. tuberculosis* eine Thymin-Base zu finden ist, während bei anderen Mitgliedern des TBC (*M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* und *M. bovis BCG*) eine Cytosin-Base vorliegt. Dieser Ein-Basen-Polymorphismus ist spezifisch für *M. tuberculosis*.

Der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infektion durch Erregerstämme der Art *M. tuberculosis* findet erfindungsgemäß bevorzugt durch Analyse der Schmelztemperaturen der spezifischen Hybridisierung eines markierten Hybridisierungssondenpaars mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 9 oder dem

Paar der komplementären Sequenzen mit einer *narGHJI*-Promotorregion spezifisch für *M. tuberculosis* statt. Die Erregerstämme der Art *M. tuberculosis* zeichnen sich dabei durch Schmelztemperaturen von insbesondere weniger als 61°C, bevorzugt weniger als 59°C, besonders bevorzugt von etwa 57°C, aus. Dem gegenüber besitzen die Erregerstämme der von *M. tuberculosis* zu unterscheidenden Mykobakterienarten *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* und *M. bovis BCG* beim Einsatz des markierten Hybridisierungssondenpaars SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 9 Schmelztemperaturen von insbesondere mehr als 59°C, bevorzugt von mehr als 61°C, besonders bevorzugt von etwa 63°C.

In Abhängigkeit von den aktuell herrschenden Hybridisierungsbedingungen, beispielsweise von der Pufferzusammensetzung, von der Ausführung der Sonden als markierte Sonden oder durch Modifizierung der Nucleotidsequenz der Sonden kann es zu geringen Änderungen der absoluten Schmelztemperaturen kommen; selbstverständlich stellen alle diejenigen Verfahren, bei denen derart geänderte Schmelztemperaturen auftreten, bevorzugte Ausführungsformen hier vorgestellter erfindungsgemäßer Verfahren dar.

In einer weiteren Variante findet der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infektion durch Erregerstämme der Art *M. tuberculosis*, das heißt insbesondere der Stämme *M. tuberculosis* H37v (ATCC 25618) und *M. tuberculosis* Erdmann (ATCC 35801) sowie weiterer klinischer Stämme, erfindungsgemäß bevorzugt durch Analyse der Schmelztemperaturen der spezifischen Hybridisierung eines markierten Hybridisierungssondenpaars mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 10 oder dem Paar der komplementären Sequenzen mit einer *narGHJI*-Promotorregion spezifisch für *M. tu-*

berculosis statt. Die Erregerstämme der Art *M. tuberculosis* zeichnen sich dabei durch Schmelztemperaturen von insbesondere mehr als 58°C, bevorzugt mehr als 60°C, besonders bevorzugt von etwa 62°C aus. Demgegenüber besitzen die Erregerstämme von *M. africanum*,  
 5 *M. microti*, *M. bovis* und *M. bovis BCG* beim Einsatz des markierten Hybridisierungssondenpaars SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 10 Schmelztemperaturen von insbesondere weniger als 62°C, bevorzugt von weniger als 60°C, besonders bevorzugt von etwa 58°C.

*Erste der  
Erfindung*

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahrens wird im Wesentlichen



in einem weiteren Schritt b) mindestens ein DNA-Fragment des 16S-rRNA-Gens, insbesondere von Mykobakterien, aus der extrahierten DNA amplifiziert, wobei das mindestens eine amplifizierte DNA-Fragment mindestens eine Region enthält, insbesondere daraus besteht, welche spezifisch für Mykobakterien ist, wobei die Amplifikation des mindestens einen DNA-Fragments mittels Primern, insbesondere mittels eines Primerpaares, erfolgt, welche die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 1 und in SEQ ID NO: 3 und/oder  
 15 die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 2 und in SEQ ID NO: 3 enthalten, insbesondere daraus bestehen, und

in einem weiteren Schritt c) erfolgt die spezifische Hybridisierung der mindestens einen Mykobakterien-spezifischen Region, das heißt der gattungsspezifischen Region des mindestens einen amplifizierten DNA-Fragments des 16S-rRNA-Gens mit mindestens einer Hybridisierungssonde, insbesondere mit mindestens eines Paares markierter Hybridisierungssonden, wobei die Hybridisierungssonden Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 4 und in SEQ ID NO: 5 enthalten, insbesondere daraus bestehen, und wobei der spezifische  
 25

Nachweis der Gattung *Mycobacterium* gegenüber Erregern, welche nicht der Gattung *Mycobacterium* angehören, das heißt nicht-Mykobakterien, mittels Analyse der Schmelztemperatur der spezifischen Hybridisierung der eingesetzten Hybridisierungssonden, das heißt mittels Schmelzkurvenanalyse. Dabei erfolgen bevorzugt die weiteren Schritte b) und c) zum gattungsspezifischen Nachweis von Mykobakterien, zeitlich nach der Extraktion von mikrobieller DNA aus dem klinischen Material im vorgenannten Schritt a) und - in einer ersten Variante - zeitlich vor den vorgenannten Schritten d) und e) zum artspezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*, oder - in einer weiteren Variante - zeitlich nach den Schritten d) und e). In einer besonders bevorzugten Variante erfolgen die Schritte b) und c) im Wesentlichen gleichzeitig mit den Schritten d) und e) in einem parallelen Ansatz oder in demselben Reaktions-Ansatz, insbesondere im Zusammenhang mit einer Multiplex-PCR.

Der eindeutige Nachweis einer Mykobakterieninfektion gegenüber anderen mikrobiellen Infektionen durch nicht-Mykobakterien, findet erfindungsgemäß bevorzugt durch Analyse der Schmelztemperaturen der spezifischen Hybridisierung eines markierten Hybridisierungssondenpaars mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 oder dem Paar der komplementären Sequenzen davon mit der gattungsspezifischen Region III („genus III“) des 16S-rRNA-Gens der isolierten mikrobiellen DNA statt. Mykobakterienstämme zeichnen sich dabei bevorzugt durch Schmelztemperaturen von mindestens 55°C, insbesondere von etwa 55°C und von etwa 61,5°C aus, wobei der Mykobakterien-Stamm *M. chelonae* insbesondere eine Schmelztemperatur von etwa 55°C aufweist und insbesondere alle anderen Mykobakterien-Stämme insbesondere eine Schmelztemperatur von 61,5°C aufweisen. Demgegenüber zei-

gen nicht-Mykobakterienarten entweder gar keine Hybridisierung oder aber eine deutlich verminderte Schmelztemperatur von etwa 43 bis 44°C.

Die Erfinder fanden auch überraschend, dass bei der Verwendung von mindestens einem Primer, insbesondere eines Primerpaares, umfassend die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 6 und/oder umfassend die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 7 zur Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien die Amplifikation lediglich bei Erregerstämmen des TBC erfolgt, das heißt zu einem Amplifikationsprodukt führt. Bei nicht-tuberkulösen Erregern oder nicht-mykobakteriellen Erregern findet hingegen keine Amplifikation statt, das heißt es wird kein entsprechendes Amplifikationsprodukt erhalten. Durch die Verwendung der vorgenannten erfindungsgemäßen Primer gelingt besonders vorteilhaft die eindeutige Unterscheidung, insbesondere den gemeinsamen und jeweils spezifischen Nachweis, von Erregerstämmen des TBC, insbesondere *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG, gegenüber Erregerstämmen nicht-tuberkulöser Mykobakterien, beispielsweise *M. avium*, *M. paratuberculosis* oder *M. intracellulare*, und/oder gegenüber nicht-Mykobakterien, beispielsweise nicht-mykobakterielle Actinomyceten, Erreger der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Enterococcus* sowie *Proteus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* oder *Pseudomonas* oder pilzliche Erreger.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zum gemeinsamen Nachweis von Erregern des TBC in klinischem Material, welches im Wesentlichen die vorgenannten Schritte a) und

d) und einen weiteren Schritt e') umfasst, wobei in dem weiteren Schritt e') die Gegenwart eines Amplifikationsprodukts der *narGHJI*-Promotorregion insbesondere durch mindestens eine Hybridisierungs-  
 5 sonde spezifisch für das amplifizierte DNA-Fragment, bevorzugt durch ein Verfahren gemäß vorgenanntem Schritt e), detektiert wird und so Erregerstämme des TBC gegenüber nicht-tuberkulösen Erre-  
 10 gern und/oder gegenüber nicht-Mykobakterien nachgewiesen werden. In einer alternativen Variante wird das Auftreten eines Amplifi-  
 kationsprodukts in an sich bekannter Weise, insbesondere durch  
 15 elektrophoretische Methoden detektiert.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Prob-  
 lem wird weiter gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum  
 spezifischen Nachweis von *M. bovis* BCG in klinischem Material,  
 wobei im Wesentlichen

15 in einem Schritt a) mikrobielle DNA extrahiert wird,  
 in einem weiteren Schritt h) aus der extrahierten DNA mindestens  
 ein DNA-Fragment amplifiziert wird, welches diejenigen Regionen  
 des Mykobakteriengenoms enthalten, welche die RD1-Region („regi-  
 20 on of difference 1“) flankieren und/oder die RD1-Region teilweise  
 oder vollständig enthalten, bevorzugt daraus bestehen, und

in einem weiteren Schritt i) mindestens eine Hybridisierungs-  
 sonde, insbesondere einer markierten Hybridisierungs-  
 25 sonde, bevorzugt ein Paar markierter Hybridisierungs-  
 sonden, mit dem mindestens einen  
 amplifizierten DNA-Fragment spezifisch hybridisieren und diese  
 Hybridisierung detektiert wird, wobei die mindestens eine Hybridisie-  
 rungs-sonde die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 19 oder  
 die komplementäre Sequenz davon enthält, insbesondere daraus

besteht, und wobei der spezifische Nachweis von *M. bovis* BCG gegenüber anderen Mitgliedern des TBC, das heißt *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti*, mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.

- 5 Erfindungsgemäß bevorzugt wird in dem vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren in Schritt h) die Amplifikation durch ein oder mehrere Primer vermittelt, welche die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 15 und/oder in SEQ ID NO: 16 enthalten, insbesondere daraus bestehen, und insbesondere als Vorwärtsprimer („forward-primer“) dienen, und durch bevorzugt mindestens einen weiteren Primer, der die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 10 17 enthält, insbesondere daraus besteht, und insbesondere als Rückwärts-Primer („reverse-primer“) dient. Erfindungsgemäß bevorzugt wird in Schritt i) die spezifische Hybridisierung mit mindestens 15 einem Paar markierter Hybridisierungssonden durchgeführt, welche die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 18 und in SEQ ID NO: 19 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon enthalten, insbesondere daraus bestehen.

- 20 Der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infektion durch Erregerstämme der Art *M. bovis* BCG, das heißt insbesondere der Stämme Pasteur (ATCC 35734), Copenhagen (ATCC 27290), Moreau (ATCC 35736), Tice (ATCC 35743), Connaught (ATCC 35745) sowie weiterer klinischer Stämme, gegenüber den Stämmen anderer Arten des TBC, insbesondere bovinen Erregerstämmen der Art *M. bovis*, findet 25 erfindungsgemäß bevorzugt durch Analyse der Schmelztemperaturen der spezifischen Hybridisierung eines markierten Hybridisierungssondenpaars mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 18 und SEQ ID NO: 19 oder dem Paar der komplementären Sequenzen mit



RD1 flankierenden Regionen des Mykobakteriengenoms, welche bei *M. bovis* BGC aufgrund des Fehlens des 9650 bp RD1-Genomabschnitts im amplifizierten DNA-Fragment, bevorzugt unmittelbar, aneinander stoßen, und daher diese Genomregionen spezifisch für *M. bovis* BGC sind, statt. Die Erregerstämme von *M. bovis* BGC zeichnen sich dabei durch Schmelztemperaturen von insbesondere weniger als 53°C, bevorzugt weniger als 51°C, besonders bevorzugt von etwa 49°C, aus. Demgegenüber besitzen die Erregerstämme von *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* Schmelztemperaturen von insbesondere mehr als 58°C, bevorzugt von mehr als 60°C, besonders bevorzugt von etwa 62°C.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahrens enthält dieses zusätzlich im Wesentlichen

einen weiteren Schritt f) mindestens ein DNA-Fragment des *oxyR*-Gens von Mykobakterien aus der extrahierten DNA amplifiziert wird, wobei das mindestens eine DNA-Fragment des *oxyR*-Gens mindestens einen DNA-Polymorphismus spezifisch für bovine Mykobakterien, das heißt *M. bovis* und *M. bovis* BCG, aufweist und wobei die Amplifikation mittels mindestens einem Primer, insbesondere einem Primerpaar, welches die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 11 und in SEQ ID NO: 12 enthält, insbesondere daraus besteht, durchgeführt wird, und

einen weiteren Schritt g) eine spezifische Hybridisierung des mindestens einen amplifizierten DNA-Fragments des *oxyR*-Gens mit mindestens einer Hybridisierungssonde, insbesondere mittels mindestens einem Paar markierter Hybridisierungssonden, welche die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 13 und in SEQ ID NO: 14

oder das Paar der komplementären Sequenzen davon enthalten, insbesondere daraus bestehen, detektiert wird und der gemeinsame Nachweis von bovinen Mykobakterien, das heißt von *M. bovis* und *M. bovis* BCG gegenüber *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.

An Position 285 des *oxyR*-Gens von Mykobakterien ist bei bovinen Mykobakterien, das heißt bei Erregerstämmen der Arten *M. bovis* und *M. bovis* BCG, eine Adenin-Base zu finden, während bei anderen Mitgliedern des TBC (*M. africanum*, *M. microti* und *M. tuberculosis*) eine Guanin-Base vorliegt. Dieser Ein-Basen-Polymorphismus ist spezifisch für bovine Mykobakterien.

Der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infektion durch bovine Erregerstämmen der Art *M. bovis*, das heißt insbesondere des Stamms ATCC 19210 sowie weiterer klinischer Stämme, und der Art *M. bovis* BCG, das heißt insbesondere der Stämme Pasteur (ATCC 35734), Copenhagen (ATCC 27290), Moreau (ATCC 35736), Tice (ATCC 35743), Connaught (ATCC 35745) sowie weiterer klinischer Stämme, findet erfindungsgemäß bevorzugt durch Analyse der Schmelztemperaturen der spezifischen Hybridisierung eines markierten Hybridisierungssondenpaars mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 14 oder dem Paar der komplementären Sequenzen mit der Region des *oxyR*-Gens, welche spezifisch für bovine Mykobakterien ist, statt. Die Erregerstämmen boviner Mykobakterien zeichnen sich dabei durch Schmelztemperaturen von insbesondere weniger als 63°C, bevorzugt weniger als 61°C, besonders bevorzugt von etwa 59°C, aus. Demgegenüber besitzen die Erregerstämmen von *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* Schmelz-

temperaturen von insbesondere mehr als 65°C, bevorzugt von mehr als 67°C, besonders bevorzugt von etwa 68°C.

Die weiteren Schritte f) und g) zum artspezifischen Nachweis von bovinen Mykobakterien erfolgen bevorzugt zeitlich nach der Extraktion von mikrobieller DNA aus dem klinischen Material im vorgenannten Schritt a) und zeitlich vor den vorgenannten Schritten d) und e) und/oder vor den vorgenannten Schritten b) und c) und/oder vor den vorgenannten Schritten h) und i) zum artspezifischen Nachweis von *M. bovis* BCG oder die weiteren Schritte f) und g) erfolgen zeitlich nach den Schritten d) und e) und/oder nach b) und c) und/oder nach h) und i). In einer weiteren Variante erfolgen die Schritte f) und g) in einem parallelen Ansatz oder in demselben Reaktionsansatz im Wesentlichen gleichzeitig mit den Schritten d) und e) und/oder b) und c) und/oder h) und i). In einer besonders bevorzugten Variante erfolgen die Schritte h) und i) im Wesentlichen gleichzeitig mit den Schritten f) und g) in einem parallelen Ansatz oder in demselben Reaktionsansatz, insbesondere in einer Multiplex-PCR. Bevorzugt erfolgen die Schritte a) und b) bis e) zeitlich vor den Schritten f) bis i).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein kombiniertes Verfahren zum jeweils spezifischen Nachweis von Erregern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex in klinischem Material, das heißt von Erregerstämmen der Art *M. tuberculosis* gegenüber *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* und *M. microti*, von Erregerstämmen der Art *M. bovis* gegenüber *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* und *M. microti* und von Erregerstämmen der Art *M. bovis* BCG gegenüber *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti*. Dieses Verfahren beinhaltet im Wesentlichen

die Extraktion mikrobieller DNA aus klinischem Material im vorgenannten Schritt a)

5 einen ersten Lauf, insbesondere einen Multiplex-PCR Ansatz, umfassend die Schritte b) bis e) gemäß den vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren zum, insbesondere gemeinsamen und gleichzeitigen, gattungsspezifischen Nachweis von Erregerstämmen der Gattung *Mycobacterium* und artspezifischen Nachweis von Erregerstämmen der Art *M. tuberculosis* sowie

10 einen zweiten Lauf, insbesondere einen Multiplex-PCR Ansatz, umfassend die Schritte f) bis h) zum, insbesondere gemeinsamen und gleichzeitigen, artspezifischen Nachweis von Erregerstämmen der Arten *M. bovis* und *M. bovis* BCG gegenüber *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* und von Erregerstämmen der Art *M. bovis* BCG gegenüber *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti*.

20 Die Erfindung sieht vorteilhafterweise also vor, dass insbesondere in einem einheitlichen und gemeinsamen Verfahrensgang der Nachweis von Mykobakterien als Gattung gegenüber nicht-Mykobakterien als Gattung zusammen mit dem artspezifischen Nachweis einzelner Mitglieder des TBC, insbesondere von *M. tuberculosis*, ermöglicht wird. Die Erfindung ermöglicht auch einen insbesondere gemeinsamen einheitlichen spezifischen Nachweis der Gattung *Mycobacterium* zusammen mit dem artspezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*, *M. bovis* und/oder *M. bovis* BCG.

25 Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass in kombinierten Nachweisverfahren zur Diagnose von Mykobakterieninfektionen sowohl eine bestehende Mykobakterieninfektion gegen-

über anderen mikrobiellen Infektionen, eine Tuberkulose gegenüber nicht-tuberkulösen Infektionen eindeutig, sicher und insbesondere gleichzeitig, bevorzugt in einem einzigen routinediagnostischen Ansatz, erkannt werden kann. Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass zusätzlich, insbesondere gleichzeitig, zu einer Identifikation der Gattung *Mycobacterium* gezielt und eindeutig Mykobakterienstämme der Art *M. tuberculosis*, *M. bovis* und/oder *M. bovis BCG* nachgewiesen und jede dieser Arten einzeln identifiziert werden können. Die erfindungsgemäßen Nachweisverfahren erlauben daher insbesondere eine eindeutige und sichere Früherkennung einer Mykobakterieninfektion und die eindeutige und sichere Früherkennung der Art-Zugehörigkeit isolierter Erregerstämme des TBC zu entweder *M. tuberculosis*, *M. bovis* und/oder *M. bovis BCG*. Dies ermöglicht besonders vorteilhaft eine schnelle und gezielte Therapie des infizierten Organismus.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im Wesentlichen in der Routinediagnostik eingesetzt und im Wesentlichen in Routinelabors durchgeführt. Die Durchführung des Verfahrens in speziell ausgestatteten und aufwendig gestalteten Sicherheitslabors für die Kultivierung hochinfektiöser Erregerstämme ist nicht notwendig. Daher kann das erfindungsgemäße Verfahren einer breiten Anwenderschaft zugeführt werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter klinischem Material im Wesentlichen klinische Proben, das heißt Patientenmaterial wie Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut, aber auch Biopsien, insbesondere Punktat-Biopsien, beispielsweise aus Halslymphknoten, verstanden. Unter klinischem Material werden aber auch Kulturisolate, beispielsweise

aus Flüssigkultur verstanden, insbesondere aus Flüssigkultur zur selektiven Kultivierung säurefester Stäbchen insbesondere aus Patientenmaterial.

5 Bevorzugt wird die mikrobielle DNA aus dem klinischen Material in an sich bekannter Weise, insbesondere mittels DNA-Präparationskits wie dem QIAmp™ DNA Mini Kit der Firma Qiagen aus dem klinischen Material extrahiert.

10 Erfindungsgemäß bevorzugt wird zur Amplifikation eines DNA-Fragments mit einem DNA-Polymorphismus des *narGHJI*-Gens spezifisch für Erregerstämme der Art *M. tuberculosis* aus der extrahierten DNA mit einer Länge von 155 bp das Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6 als Vorwärtsprimer und SEQ ID NO: 7 als Rückwärtsprimer eingesetzt. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auch mindestens ein Oligonucleotid-Primer, be-  
15 vorzugt mindestens ein Oligonucleotid-Primerpaar zur Amplifikation eines DNA-Fragments der *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Gens enthaltend, insbesondere bestehend aus, Nucleinsäuremoleküle mit Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 6 und/oder SEQ ID NO: 7.

20 Erfindungsgemäß bevorzugt wird zur Amplifikation der gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien das Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1 als Vorwärtsprimer und SEQ ID NO: 3 als Rückwärtsprimer eingesetzt. Das mit dem Primerpaar amplifizierte 1000 bp lange DNA-Fragment  
25 enthält sowohl die konservierte gattungsspezifische Region III („genus III“) als auch eine hochvariable artspezifische Region des TBC und *M. avium*. Erfindungsgemäß bevorzugt ist die zusätzliche oder alternative Verwendung von mindestens einem weiteren Primerpaar

umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 als Vorwärtsprimer und SEQ ID NO: 3 als Rückwärtsprimer vorgesehen, welches ein 100 bp langes Fragment desselben Gens enthaltend die gattungsspezifische Region III amplifiziert.

- 5 Erfindungsgemäß bevorzugt wird zur Amplifikation eines DNA-Fragments mit einem DNA-Polymorphismus des *oxyR*-Gens spezifisch für bovine Mykobakterien aus der extrahierten DNA mit einer Länge von 200 bp das Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 11 als Vorwärtsprimer und SEQ ID  
10 NO: 12 als Rückwärtsprimer eingesetzt. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auch mindestens ein Oligonucleotid-Primer, bevorzugt mindestens ein Oligonucleotid-Primerpaar zur Amplifikation eines DNA-Fragments der für bovine Mykobakterien spezifischen Region des *oxyR*-Gens enthaltend, insbesondere bestehend aus,  
15 Nucleinsäuremoleküle mit Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 11 und/oder SEQ ID NO: 12.

- Erfindungsgemäß bevorzugt wird zur Amplifikation von DNA-Fragmenten enthaltend RD1 flankierende Regionen spezifisch für *M. bovis* BCG aus der extrahierten DNA Primerpaare umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 15 und/oder SEQ ID NO: 16 als  
20 Vorwärtsprimer und SEQ ID NO: 17 als Rückwärtsprimer eingesetzt, wobei das Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 15 / SEQ ID NO: 17 DNA-Fragmente mit einer Länge von 320 bp von Erregerstämmen der Art *M. bovis* BCG amplifiziert und das  
25 Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 16 / SEQ ID NO: 17 DNA-Fragmente mit einer Länge von 290 bp von Erregerstämmen der Art *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* oder *M. microti* amplifiziert. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind

daher auch Oligonucleotid-Primer, zur Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments enthaltend RD1 flankierende Regionen des Mykobakteriengenoms, welche die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 15, in SEQ ID NO: 16 und/oder in SEQ ID NO: 17 enthalten, insbesondere daraus bestehen.

Die Erfindung betrifft bevorzugt auch Primer und/oder Primerpaare zur Amplifikation der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Fragmente, welche gegenüber den vorgenannten erfindungsgemäßen Primern umfassend die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 1, 2 und 3, sowie 6 und 7 sowie 11 und 12 sowie 15, 16 und 17 jeweils degenerierte, mutierte oder modifizierte Sequenzen oder Fragmente davon, die mit der jeweiligen Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 1, 2 und 3, sowie 6 und 7 sowie 11 und 12 sowie 15, 16 und 17, wovon sie jeweils abgeleitet sind, hybridisieren, wobei jeweils ein Homologiegrad, bevorzugt über die gesamte Länge der Sequenz, von mindestens 92 %, bevorzugt von mindestens 97%, besonders bevorzugt von mindestens 98 % zu der ursprünglichen Nucleotidsequenz besteht. Dabei weisen die abgeleiteten Fragmente jeweils eine Sequenzlänge auf, welche bevorzugt maximal etwa 98% der Länge der Nucleotidsequenz, besonders bevorzugt maximal etwa 95%, maximal etwa 90%, maximal etwa 75%, maximal etwa 50% oder maximal etwa 25% beträgt. Insbesondere bevorzugt ist das abgeleitete Fragment um maximal 10, um maximal 5, um 4, 3, oder 2 Nucleotide oder um ein Nucleotid gegenüber der ursprünglichen Nucleotidsequenz verkürzt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „modifizierte Sequenz“ oder „modifizierte Nucleotidsequenz“



eine Nucleinsäuresequenz verstanden, die sich durch Austausch, Inversion, Deletion oder Addition von mindestens einem Nucleotid, auch einem ungewöhnlichen oder synthetischen Nucleotid, von ihrer ursprünglichen Sequenz, in mindestens einem Nucleotid, bevorzugt in zwei Nucleotiden, unterscheidet. In diesem Zusammenhang wird unter dem Begriff „modifiziert“ eine Eigenschaft verstanden, die sich auf eine modifizierte Nucleotidsequenz bezieht.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter den Formulierungen „Primer, welcher die Nucleotidsequenz umfasst“ oder „Hybridisierungssonde, welche die Nucleotidsequenz umfasst“ oder ähnlichen verstanden, dass die jeweiligen Primer und Sonden die Nucleotidsequenzen aufweisen, das heißt, aus den konkret genannten Nucleotidsequenzen allein bestehen. Unter der Formulierung wird auch verstanden, dass die jeweiligen Primer und Sonden neben den konkret genannten Nucleotidsequenzen gegebenenfalls aus mindestens einer weiteren zusätzlichen Sequenz bestehen. Diese zusätzliche Sequenz flankiert die konkret genannten Nucleotidsequenzen und besitzt eine Sequenzlänge, welche bevorzugt maximal etwa 100% der Länge der konkret genannten Nucleotidsequenz, besonders bevorzugt maximal etwa 75%, maximal etwa 50%, maximal etwa 25%, maximal etwa 10%, maximal etwa 5% oder maximal etwa 2% beträgt. Insbesondere bevorzugt besitzt die zusätzliche Sequenz eine Länge von 10 bis 5 Nucleotiden, von 4, 3, 2 Nucleotiden oder besteht aus einem einzigen Nucleotid.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter den Begriffen „Region“, „Fragment“, „Zielregion“ oder „flankierende Region“ mindestens ein zusammenhängender Bereich auf einem linearen, strangförmigen Desoxy- oder Ribonucleinsäuremolekül, das

heißt DNA oder RNA, oder verstanden, welcher, in der Anzahl der Nucleotide dieses Moleküls gemessen, in 5' zu 3'-Leserichtung stromabwärts und/oder stromaufwärts von einem bestimmten nummerierten Nucleotid des Moleküls, das heißt einer bestimmten Position, aus bevorzugt 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5<sup>1,4,3</sup> oder 2 Nucleotiden des Moleküls besteht.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorgenannten Verfahren wird die Amplifikation der DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Bevorzugt wird die PCR-Amplifikation mittels Echtzeit-PCR (Rapid-Cycle-PCR) durchgeführt. Im Echtzeit-PCR Verfahren ist es möglich, die Vervielfachung der PCR-Produkte in Echtzeit Amplifikations-Zyklus für Amplifikations-Zyklus zu beobachten. Besonders bevorzugt wird die Amplifikation in einem LightCycler<sup>TM</sup>-System der Firma Roche Molecular Biochemicals durchgeführt, das eine Ausgestaltung der Echtzeit-PCR ist. Zu diesem Zweck werden insbesondere der PCR-Ausgangsmischung neben der Polymerase, den Nucleotiden, den Pufferlösungen und den Primern auch Hybridisierungs sonden zugegeben, die spezifisch an die gewünschten PCR-Amplifikationsprodukte binden. Dabei werden insbesondere zwei sequenzspezifische Oligonucleotidsonden verwendet, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind. Die Sequenzen der erfindungsgemäßen markierten Hybridisierungs sonden-Paare sind so ausgewählt, dass sie auf eine Weise an die Zielsequenzen des amplifizierten DNA-Fragments hybridisieren, dass insbesondere das 3'-Ende der einen Sonde dicht bei dem 5'-Ende der anderen Sonde liegt, wodurch die beiden Farbstoffe in unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht werden, insbesondere beträgt der Abstand zwischen den beiden Sonden zwischen 1 und 5 Nucleotide. Insbesondere kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanz-

Energietransfer (FRET) zwischen den beiden Farbstoffen der Hybridisierungs sonden und damit zu einer Verschiebung des Fluoreszenzspektrums, wobei das Maß an Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich eine Funktion der Menge an detektierter DNA ist.

- 5 Durch das FRET-System sind erfindungsgemäß auch quantitative Messungen der Menge amplifizierter DNA-Fragmente vorgesehen. Die erfindungsgemäßen ausgewählten Hybridisierungs sonden können quantitativ, also stöchiometrisch, an die amplifizierten Fragmen-  
10 te binden. Dabei ist die quantitative Hybridisierung insbesondere abhängig von der Temperatur und dem Homologiegrad der verwendeten Oligonucleotidsonden mit der detektierten Sequenz auf dem amplifizierten DNA-Fragment.

- In einer bevorzugten Ausführungsform wird die vorgenannte fluorimetrische Detektion spezifischer DNA-Sequenzen in den amplifizier-  
15 ten Fragmenten nach einer Amplifikation der Fragmente mittels herkömmlicher PCR durchgeführt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die fluorimetrische Detektion in einer Echtzeit-PCR während der Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei beispielsweise die Zunahme an produzierter DNA als Zunahme im Fluoreszenzsignal verfolgt werden kann.  
20

- In einer bevorzugten Ausführungsform des vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die spezifische Detektion der art-spezifischen Regionen und/oder der gattungsspezifischen Region in den amplifizierten DNA-Fragmenten nach Beendigung der Amplifika-  
25 tionsreaktion, wobei nach Hybridisierung des Hybridisierungssondenpaars, bevorzugt eines FRET-Paars an die zu detektierenden Regionen die Temperatur im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse verändert wird, bevorzugt kontinuierlich erhöht wird, und gleichzeitig

- die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen wird. Auf diese Weise wird eine Schmelztemperatur bestimmt, bei der die Hybridisierungssonden, insbesondere das eingesetzte FRET-Paar, gerade nicht mehr an die zu detektierende Region des amplifizierten DNA-Fragments hybridisieren. Der wesentliche Aspekt einer Schmelzkurvenanalyse besteht darin, dass es bei Auftreten von Fehlpaarungen zwischen dem eingesetzten Hybridisierungssondenpaar und der Zielregion auf dem amplifizierten DNA-Fragment zu einer Reduktion des gemessenen Schmelzpunktes kommt. Auf diese Weise werden erfindungsgemäß mit Hybridisierungssonden, insbesondere mit einem FRET-Paar, die Regionen von DNA-Fragmenten identifiziert, deren Sequenzen sich voneinander insbesondere nur geringfügig, durch eine oder wenige Punktmutationen, in der Nucleotidsequenz unterscheiden.
- 5
- 10
- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens eine Oligonucleotid-Hybridisierungssonde, welche spezifisch mit der gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien hybridisiert, welches das Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 4 oder mit der komplementären Sequenz davon enthält, insbesondere daraus besteht. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens ein Oligonucleotid-Hybridisierungssondenpaar, welches die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 3 und in SEQ ID NO: 4 oder mit den komplementären Sequenzen davon enthält, insbesondere daraus besteht.
- 20
- 25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens eine Oligonucleotid-Hybridisierungssonde, welche spezifisch mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-

Nitratreduktase-Operons hybridisiert, welches das Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 9 oder mit der komplementären Sequenz davon enthält, insbesondere daraus besteht. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens ein Oligonucleotid-Hybridisierungssondenpaar, welches die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 8 und in SEQ ID NO: 9 oder mit den komplementären Sequenzen davon enthält, insbesondere daraus besteht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch eine weitere oder alternative Oligonucleotid-Hybridisierungssonde, welche spezifisch mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons hybridisiert, welches das Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 10 oder mit der komplementären Sequenz davon enthält, insbesondere daraus besteht. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens ein Oligonucleotid-Hybridisierungssondenpaar, welches die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 8 und in SEQ ID NO: 10 oder mit den komplementären Sequenzen davon enthält, insbesondere daraus besteht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens ein Oligonucleotid-Hybridisierungssondenpaar, welches die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 13 und in SEQ ID NO: 14 oder mit den komplementären Sequenzen davon enthält, insbesondere daraus besteht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens ein Oligonucleotid-Hybridisierungssondenpaar, welches die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 18

und in SEQ ID NO: 19 oder mit den komplementären Sequenzen davon enthält, insbesondere daraus besteht.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird die Detektion der vorgenannten artspezifischen Regionen enthaltenden DNA-Fragmente mit markierten den vorgenannten Hybridisierungs sonden durchgeführt, welche als FRET-Paare ausgeführt sind, wobei jeweils ein Hybridisierungssonden-Partner als Donor-Komponente = „Anker-Sonde“ („anchor probe“) ausgeführt ist, die vorzugsweise am 3'-terminalen Nucleotid mit einem Farbstoff, vorzugsweise mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, besonders bevorzugt mit Fluorescein assoziiert ist. Erfindungsgemäß sind bevorzugt als Anker-Sonden vorgesehen die Hybridisierungssonden umfassend die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 4, 8, 13 oder 18 oder die jeweils komplementären Sequenzen davon.

Der jeweils andere Hybridisierungssonden-Partner, des Hybridisierungssonden ist als Akzeptor-Komponente = Sensor-Sonde („sensor probe“) ausgeführt, welche vorzugsweise am 5'-terminalen Nucleotid mit einem weiteren Farbstoff, vorzugsweise mit einem Rhodamin-Derivat assoziiert ist. Erfindungsgemäß sind bevorzugt als Sensor-Sonden vorgesehen die Hybridisierungssonden umfassend die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 5, 9, 10, 14 oder 19 oder die jeweils komplementären Sequenzen davon. In bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsformen ist das Rhodamin-Derivat LightCycler-Red 640®; in weiteren bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsform ist das Rhodamin-Derivat LightCycler-Red 705®; in weiteren bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsform ist das Rhodamin-Derivat Cy5. Besonders bevorzugt tragen die für den erfindungsgemäßen artspezifischen Nach-

weis von *M. tuberculosis* oder *M. bovis* BCG eingesetzten markierten Sensor-Sonden den Farbstoff LightCycler-Red 640<sup>®</sup>, die für den erfindungsgemäßen Nachweis von *M. bovis* mit *M. bovis* BCG eingesetzten markierten Sensor-Sonden den Farbstoff LightCycler-Red 705<sup>®</sup>.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind selbstverständlich auch Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wie ein Kit zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* in klinischem Material, welches

10 mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6 / SEQ ID NO: 7, und

mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 9 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon und/oder mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen

15 SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 10 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon, beinhaltet.

In einer bevorzugten Ausführungsform beinhaltet dieses Kit außerdem:

20 mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 3 und/oder mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 / SEQ ID NO: 3 und

mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Kit zum gemeinsamen und spezifischen Nachweis von *M. bovis* und/oder *M. bovis* BCG, in klinischem Material, welches

mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen  
5 SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 12,

mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 13 / SEQ ID NO: 14 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon,

mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen  
10 SEQ ID NO: 15 / SEQ ID NO: 17 und/oder mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 16 / SEQ ID NO: 17 und

mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 19 oder das Paar der  
15 komplementären Sequenzen davon beinhaltet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung mindestens eines *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus in der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien, insbesondere an Position 215 in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Operons zum spezifischen Nachweis einer Infektion mit *M. tuberculosis*. In einer besonders bevorzugten Variante ist dieser Genomabschnitt dadurch gekennzeichnet, das er die Nucleinsäuresequenz dargestellt in SEQ ID NO: 10 oder  
20 die komplementäre Sequenz davon enthält, insbesondere aus dieser besteht. Bevorzugt erfolgt die erfindungsgemäße Verwendung in  
25 mindestens einem PCR-Ansatz mit anschließender oder gleichzeiti-



ger Hybridisierung, beispielsweise in einer Echtzeit-PCR oder in an sich bekannten Verfahren der klassischen Hybridisierung, der DNA-Sequenzierung, insbesondere in einem Kapillarsequenziergerät, der allelspezifischen PCR, des OLA („oligonucleotide-ligation assay“),  
 5 des SSCP („single strand conformation polymorphism“) oder der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE). Alternative Verfahren zur Amplifikation bestehen dabei neben der PCR beispielsweise in den bekannten Verfahren NASBA, SDA oder LCR.

Die Erfindung wird anhand des anhängenden Sequenzprotokolls,  
 10 das die Sequenzen Nr. 1 bis 19 enthält, anhand der Figuren 1 bis 4 sowie anhand der Beispiele 1 bis 3 näher erläutert.

SEQ ID NO: 1 – Vorwärtsprimer zur Amplifikation eines 1000 bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens vom Mykobakterien, enthaltend die gattungsspezifische Region III der Gattung *Mycobacterium*,

15 SEQ ID NO: 2 – Vorwärtsprimer zur Amplifikation eines 100 bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens vom Mykobakterien, enthaltend die gattungsspezifische Region III der Gattung *Mycobacterium*,

SEQ ID NO: 3 – Rückwärtsprimer zu den Primern dargestellt in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 zur Amplifikation eines 100 bp- oder  
 20 1000bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien,

SEQ ID NO: 4 – Hybridisierungssonde, insbesondere Anker-Sonde und Donor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien,

25 SEQ ID NO: 5 – Hybridisierungssonde, insbesondere Sensor-Sonde und Akzeptor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der

gattungsspezifischen Region III des 16S-rRNA-Gens von Mykobakterien,

5 SEQ ID NO: 6 – Vorwärtsprimer zur Amplifikation eines 155 bp-Fragments des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien enthaltend einen DNA-Polymorphismus spezifisch für *M. tuberculosis*,

SEQ ID NO: 7 – Rückwärtsprimer zu SEQ ID NO: 6,

10 SEQ ID NO: 8 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Anker-Sonde und Donor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien,

SEQ ID NO: 9 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Sensor-Sonde und Akzeptor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien,

15 SEQ ID NO: 10 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Sensor-Sonde und Akzeptor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien,

20 SEQ ID NO: 11 – Vorwärtsprimer zur Amplifikation eines 200 bp-Fragments des *oxyR*-Gens von Mykobakterien enthaltend einen DNA-Polymorphismus spezifisch für bovine Mykobakterien,

SEQ ID NO: 12 – Rückwärtsprimer zu SEQ ID NO: 11,

25 SEQ ID NO: 13 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Anker-Sonde und Donor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *oxyR*-Gens von Mykobakterien,

SEQ ID NO: 14 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Sensor-Sonde und Akzeptor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *oxyR*-Gens von Mykobakterien,

- 5 SEQ ID NO: 15 – Vorwärtsprimer zur Amplifikation eines 320 bp-Fragments einer RD1 flankierenden Region von *M. bovis* BCG,

SEQ ID NO: 16 – Vorwärtsprimer zur Amplifikation eines 290 bp-Fragments einer RD1 flankierenden Region von *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti*,

- 10 SEQ ID NO: 17 – Rückwärtsprimer zu SEQ ID NO: 15 und SEQ ID NO: 16,

- SEQ ID NO: 18 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Anker-Sonde und Donor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der *M. bovis* BCG-spezifischen RD1 flankierenden Region von  
15 Mykobakterien,

SEQ ID NO: 19 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Sensor-Sonde und Akzeptor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der *M. bovis* BCG-spezifischen RD1 flankierenden Region von Mykobakterien.

- 20 Figur 1 – zeigt eine schematische Darstellung der RD1-Region und die RD1 flankierenden Regionen des Mykobakteriengenoms sowie ein dort hybridisierende Sonde und zur Amplifikation der entsprechenden DNA-Fragmente eingesetzte Primer in der Orientierung der Amplifikationsreaktion. Fehlende Übereinstimmungen der Basenpaarung des Primers mit der SEQ ID NO: 16 mit der Sequenz der RD1  
25 sind als fettgedruckte Kleinbuchstaben dargestellt. In Figur 1.A ist

die genomische Region von *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* oder *M. microti* dargestellt. In Figur 1.B ist die Region von *M. bovis* BCG dargestellt, worin die 9650 bp RD1 Region fehlt.

Figur 2 – zeigt Schmelzkurven der Hybridisierung des spezifischen Hybridisierungssondenpaars mit SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 8 mit der *M. tuberculosis*-spezifischen Region im amplifizierten 155 bp-Fragment des *narGHJ*-Promotors.

Figur 3 – zeigt Schmelzkurven der Hybridisierung des spezifischen Hybridisierungssondenpaars mit SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 10 mit der *M. tuberculosis*-spezifischen Region im amplifizierten 155 bp-Fragment des *narGHJ*-Promotors.

Figur 4 – zeigt Schmelzkurven der Hybridisierung des spezifischen Hybridisierungssondenpaars mit SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 19 mit der *M. bovis* BCG-spezifischen Region in den amplifizierten 320 bp- und 290 bp-Fragmenten der *RD1* flankierenden Regionen.

#### Beispiel 1: DNA-Isolierung

##### a) aus klinischem Material

Mikrobielle DNA wird aus klinischen Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut oder Punktat-Biopsien in an sich bekannter Weise zum Beispiel mittels eines QiaampMiniKit™ (Firma Qiagen, Katalog-Nr. 51306) aufgereinigt, das heißt extrahiert.

b) aus Kulturoisolaten

Kulturen zu diagnostizierender Mikroorganismen aus Patientenproben werden in einem automatisierten Zellkultursystem BACTEC™ MGIT™ (Becton, Dickinson and Company Diagnostic Systems, USA) in Flüssigkulturen unter Bedingungen, welche die Kultivierung säurefester Stäbchen, insbesondere von Mykobakterien, unterstützen, angezüchtet. Aus den positiven Kulturen wird die mikrobielle DNA beispielsweise mittels mechanischer Disruption erhalten. Die mikrobielle DNA wird in an sich bekannter Weise zum Beispiel mittels eines QIAmp™ DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den Kulturoisolaten extrahiert und gegebenenfalls aliquotiert.

Beispiel 2: PCR-Amplifikation

Zur Amplifikation in einer optimierten LightCycler™-PCR wird ein Ansatz beinhaltend die fertig erhältliche Mischung „LightCycler Fast-Start DNA Master Hybridisation Probes“ (Katalog-Nr. 239272, Firma Roche Molecular Biochemicals) gewählt.

Es wird folgende Reaktionsmischung für die LightCycler-Reaktion hergestellt:

- FastStart™ Taq Polymerase
- Reaktionspuffer
- Desoxy-Nucleosid-Triphosphat-Mischung (dNTP)
- 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration)
- Primer, je Primer: 18 pmol, entsprechend 1,1 µmol/l Endkonzentration

- Oligonucleotid-FRET-Sonden-Paar

je Sonde: 2 pmol, entsprechend 100 nmol/l Endkonzentration

5 Diese Reaktionsmischung wird durch Puls-Zentrifugation in die Glas-kapillaren des LightCycler-Systems verbracht und die Amplifikation nach dem „Hot Start“-Prinzip nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten mit den folgenden Schritten durchgeführt:

1. Denaturierung bei 95°C für 3 Sekunden
2. Primer-Hybridisierung bei Temperaturen von 68°C bis 62°C für 2 Sekunden („touch-down-annealing“)
- 10 3. Polymerisation bei 72°C für 40 Sekunden

Die Schritte 1 bis 3 werden insgesamt 50 mal zyklisch abgearbeitet, wobei für die ersten 5 Zyklen die Hybridisierung in Schritt 2 bei 68°C erfolgt und bei den nachfolgenden 6 Zyklen die Temperatur auf 62°C in Schritten von 1°C pro Zyklus reduziert wird und für die restlichen 15 Zyklen bei 62°C durchgeführt wird. Die Rate der Temperaturänderung liegt bei allen Schritten bei 20°C pro Sekunde.

20 Zur Amplifikation der den *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus enthaltenden Region des *narGHJI*-Promotors wird der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 6 als Vorwärtsprimer und der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 7 als Rückwärtsprimer eingesetzt. Es werden 155 bp-Fragmente des *narGHJI*-Promotors amplifiziert. Es zeigt sich weiter, dass die Verwendung dieser Primer lediglich bei Erregerstämmen des TBC zu einem Amplifikationsprodukt führen, nicht aber bei nicht-tuberkulösen Erregern oder nicht-mykobakteriellen Erregern. Daher 25 lässt die Verwendung der Primer mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6 und/oder SEQ ID NO: 7 auch die eindeutige Unterschei-

dung von Erregern von Arten des TCB gegenüber Erregern von nicht-tuberkulösen Arten und gegenüber Erregern von nicht-Mykobakterien zu.

5 Zur Amplifikation eines DNA-Fragments mit einem DNA-Polymorphismus des *oxyR*-Gens spezifisch für bovine Mykobakterien wird der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 11 als Vorwärtsprimer und der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 12 als Rückwärtsprimer eingesetzt. Es werden 200 bp-Fragmente des *oxyR*-Gens amplifiziert.

10 Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten enthaltend RD1 flankierende Regionen spezifisch für *M. bovis* BCG werden die Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 15 und/oder SEQ ID NO: 16 als Vorwärtsprimer und der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 17 als Rückwärtsprimer eingesetzt. *M. bovis* BCG fehlt als einzige  
 15 Spezies innerhalb des TBC die RD1. Die Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 15 und SEQ ID NO: 17 sind dabei komplementär mit einer das 3'-Ende von RD1 flankierenden Region beziehungsweise einer das 5'-Ende von RD1 flankierenden Region (Figur 1). Der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 16 ist gegen  
 20 das 3'-Ende von RD1, innerhalb von RD1, gerichtet (Figur 1.A). Das Primerpaar mit Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 15 / SEQ ID NO: 17 amplifiziert dabei DNA-Fragmente mit einer Länge von 320 bp von Erregerstämmen der Art *M. bovis* BCG, wenn der 9650 bp umfassende RD1-Abschnitt (siehe Figur 1 A) im  
 25 Mykobakteriengenom fehlt, was bei Erregerstämmen der Art *M. bovis* BCG der Fall ist (Figur 1 B). Das Primerpaar mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 16 / SEQ ID NO: 17 amplifiziert DNA-Fragmente mit einer Länge von 290 bp von Erregerstämmen der Arten *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* bei

*africanum* und *M. microti* bei Vorhandensein des 9650 bp umfassenden RD1-Abschnitts. Das 320 bp Fragment, daß spezifisch für *M. bovis* BCG ist, entsteht durch die Bindung der Primer mit SEQ ID NO 15 und 17 (Figur 1 B). Primer mit SEQ ID NO 16 hat kein Target, da RD1 bei *M. bovis* BCG fehlt. Das 290 bp Fragment, das spezifisch für *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti* ist, entsteht durch die Bindung der Primer mit den SEQ ID NO 16, 17 an ihr Target (Figur 1 A). Ein Primer mit SEQ ID NO 15 bindet zwar auch, aber das Fragment von 10 kbp, das theoretisch mit Hilfe der Primer mit SEQ ID NO 15 und 17 amplifiziert würde, ist zu groß, um effizient amplifiziert zu werden.

### Beispiel 3: Detektion und Schmelzkurvenanalyse

Zur Detektion der amplifizierten Fragmente werden in die Reaktionsmischung (siehe Beispiel 2) eingesetzte FRET-markierte Hybridisierungssondenpaare verwendet, wobei jeweils ein Hybridisierungssonden-Partner (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 18) als Donor-Komponente am 3'-terminalen Nucleotid mit Fluorescein assoziiert ist, und der jeweils andere Hybridisierungssonden-Partner (SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9 oder 10, SEQ ID NO: 19) als Akzeptor-Komponente am 5'-terminalen Nucleotid mit LightCycler-Green™ 640 assoziiert ist. Der Hybridisierungssonden-Partner SEQ ID NO: 14 ist als Akzeptor-Komponente am 5'-terminalen Nucleotid mit LightCycler-Green™ 705 assoziiert.

Die bei der Detektion mit den Hybridisierungssonden unmittelbar nach dem letzten Amplifikationszyklus erfolgende Schmelzkurvenanalyse beginnt mit der Denaturierung der amplifizierten Fragmente bei 95°C für 30 Sekunden, worauf eine Hybridisierung mit den vor-



genannten FRET-Paaren bei 38°C für 30 Sekunden folgt. Zur Bestimmung der Schmelzkurve der Hybridisierung wird die Temperatur anschließend kontinuierlich von 38°C auf 80°C mit einer Rate von 0,2°C pro Sekunde erhöht, wobei die von den konjugierten FRET-Paaren emittierte Fluoreszenz kontinuierlich aufgezeichnet wird. Die Fluoreszenz erlischt regelmäßig sobald mindestens ein Hybridisierungssonden-Partner abschmilzt. Zur Auswertung des Fluoreszenzsignals wird das LightCycler-„Run Profile“-Programm in der Version 3.5.3 eingesetzt, wobei die Verstärkung des F2- und F3-Kanals des photometrischen Detektors des LightCycler-Systems automatisch eingestellt wird.

Zur spezifischen Hybridisierung der den *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus enthaltenden Region des *narGHJI*-Promotors wird das FRET-markierte Hybridisierungssondenpaar mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 9 eingesetzt. Alternativ wird zur spezifischen Hybridisierung der den *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus enthaltenden Region des *narGHJI*-Promotors das FRET-markierte Hybridisierungssondenpaar mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 10 eingesetzt.

Zur spezifischen Hybridisierung der den DNA-Polymorphismus spezifisch für bovine Mykobakterien enthaltenden Region des *oxyR*-Gens wird das FRET-markierte Hybridisierungssondenpaar mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 13 / SEQ ID NO: 14 eingesetzt.

Zur spezifischen Hybridisierung der Regionen enthaltend RD1 flankierende Regionen spezifisch für *M. bovis* BCG wird das FRET-markierte Hybridisierungssondenpaar mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 19 eingesetzt. Die Primerkombination

mit SEQ ID NO 15, 16 und 17 wird mit der als Sensorsonde ausgebildeten Hybridisierungssonde mit der SEQ ID NO: 19 in einer Light-Cycler-Reaktion kombiniert. Diese Sensorsonde wurde so konstruiert, daß weder eine 100%ige Homologie zu dem 320 bp Fragment, das spezifisch für *M. bovis* BCG ist, noch zu dem 290 bp Fragment, das spezifisch für *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti* ist, besteht. Zwischen der Sonde und dem 320 bp-Fragment bestehen drei Nukleotidunterschiede (in Figur 1 B, fett- und kleingedruckte Nucleotide). Zwischen dem 290 bp-Fragment und der Sonde betehen ebenfalls drei Nukleotidunterschiede (in Figur 1 A, fett- und kleingedruckte Nucleotide). Die Unterschiede liegen jedoch an einer anderen Position innerhalb der Bindungsstelle der Sonde. Es entstehen zwei unterschiedliche Schmelzpunkte die jeweils spezifisch für das 320-bp-Fragment, also für *M. bovis* BCG, beziehungsweise für das 290-bp Fragment, also für *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti* sind (Tabelle 1).

Die Figuren 2 bis 4 und die Tabelle 1 zeigen die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse.

Art	Stamm	Schmelztemperatur [°C] der Hybridisierungssonden spezifisch für			
		<i>M. tuberculosis</i> Sonde: SEQ ID NO: 10 Zielregion: <i>narGHJI</i> -Pro.	<i>M. tuberculosis</i> Sonde: SEQ ID NO: 9 Zielregion: <i>narGHJI</i> -Pro.	bovine Mykobakterien Sonde: SEQ ID NO: 14 Zielregion: <i>oxyR</i> -Gen	<i>M. bovis</i> BCG Sonde: SEQ ID NO: 19 Zielregion: RD1
<i>M. tuberculosis</i>	H37v ATCC 25618	62,3°	56,8°	68,0°	62,6°
	Erdmann ATCC 35801	62,2°	57,0°	68,3°	62,1°
	klinische Stämme (n = 33)	62,2° (SD = 0,29)	56,9° (SD = 0,36)	68,2° (SD = 0,15)	61,9° (SD = 0,47)
<i>M. africanum</i>	klinische Stämme (n = 3)	57,9° (SD = 0,14)	63,4° (SD = 0,21)	68,0° (SD = 0,28)	62,4° (SD = 0,49)
<i>M. microti</i>	klinische Stämme (n = 2)	57,0° (SD = 0,14)	63,2° (SD = 0,28)	68,2° (SD = 0,07)	61,7° (SD = 0,07)
<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	58,2°	63,1°	59,3°	62,5°
	klinische Stämme (n = 12)	58,0° (SD = 0,22)	63,2° (SD = 0,30)	59,2° (SD = 0,13)	61,7° (SD = 0,26)
<i>M. bovis</i> BCG	Pasteur ATCC 35734	57,9°	63,6°	59,7°	49,4°
	Copenhagen ATCC 27290	58,0°	63,5°	59,0°	49,6°
	Moreau ATCC 35736	58,2°	63,7°	59,2°	49,5°
	Tice ATCC 35743	58,2°	63,5°	59,0°	49,5°
	Connaught ATCC 35745	58,2°	63,7°	59,1°	49,4°
	klinische Stämme (n = 4)	57,9° (SD = 0,26)	63,2° (SD = 0,26)	59,2° (SD = 0,09)	49,6° (SD = 0,14)

Tabelle 1

## Ansprüche

1. Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in klinischem Material umfassend die Schritte
  - a) Extraktion von mikrobieller DNA aus klinischem Material,
  - d) Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien enthaltend eine mindestens einen DNA-Polymorphismus spezifisch für *M. tuberculosis* aus der extrahierten DNA,
  - e) Detektion der spezifischen Hybridisierung des amplifizierten DNA-Fragments mit mindestens einer Hybridisierungssonde, welche die Nucleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 9, der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 und der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 10, umfasst,wobei der spezifische Nachweis von *M. tuberculosis* gegenüber *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* und *M. microti* mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der DNA-Polymorphismus an Position - 215 der Promotorregion in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstart-Codons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei in Schritt d) die Amplifikation mittels eines Primerpaares umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6 / SEQ ID NO: 7 erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei in Schritt e) die spezifische Hybridisierung mit mindestens einem Paar markierter Hybridisierungssonden umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 9 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon und/ oder die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 10 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon erfolgt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, zusätzlich umfassend die Schritte:
  - b) Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments des 16S-rRNA-Gens enthaltend mindestens eine Mykobakterien-spezifische Region mittels eines Primerpaares umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 3 und/oder SEQ ID NO: 2 / SEQ ID NO: 3 aus der extrahierten DNA und
  - c) Detektion der spezifischen Hybridisierung der gattungsspezifischen Region des vervielfachten 16S-rRNA-Fragments mittels eines Paares markierter Hybridisierungssonden, wobei das Paar die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 umfasst,wobei der spezifische Nachweis von Mykobakterien gegenüber nicht-Mykobakterien mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.
6. Verfahren zum spezifischen Nachweis von *M. bovis* BCG in klinischem Material umfassend die Schritte

- a) Extraktion von mikrobieller DNA aus klinischem Material,
- h) Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments enthaltend RD1 flankierende Regionen des Mykobakteriengenoms aus der extrahierten DNA,
- i) Detektion der spezifischen Hybridisierung des amplifizierten DNA-Fragments mit mindestens einer markierten Hybridisierungssonde, welche die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 19 oder die komplementäre Sequenz davon umfasst und

wobei der spezifische Nachweis von *M. bovis* BCG gegenüber *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* und *M. microti* mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.

- 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei in Schritt h) die Amplifikation mittels forward-Primer umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 15 und SEQ ID NO: 16 und reverse-Primer umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 17 erfolgt.
- 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, wobei in Schritt i) die spezifische Hybridisierung mit mindestens einem Paar markierter Hybridisierungssonden umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 19 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon erfolgt.
- 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, zusätzlich umfassend die Schritte

f) Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments des *oxyR*-Gens enthaltend eine mindestens einen DNA-Polymorphismus spezifisch für bovine Mykobakterien aus der extrahierten DNA mittels mindestens einem Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 12,

g) Detektion der spezifischen Hybridisierung des amplifizierten DNA-Fragments mit einem Paar markierter Hybridisierungs sonden umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 13 / SEQ ID NO: 14 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon,

wobei der gemeinsame Nachweis von *M. bovis* und *M. bovis* BCG gegenüber *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.

10. Verfahren zum gemeinsamen und jeweils spezifischen Nachweis von Erregern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* und *M. microti*) in klinischem Material umfassend

Schritte a) bis e) gemäß dem Verfahren nach Anspruch 5 zum spezifischen Nachweis einer Infektion mit *M. tuberculosis* und

Schritte f) und g) zum gemeinsamen Nachweis von *M. bovis* und *M. bovis* BCG gegenüber *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* sowie h) und i) zum spezifischen Nachweis von *M. bovis* gegenüber *M. bovis* BCG. gemäß dem Verfahren nach Anspruch 9.

11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vervielfachung der DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bevorzugt als Echtzeit-PCR, bevorzugt mittels LightCycler<sup>TM</sup>-System, durchgeführt wird.

12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Schritte spezifischer Hybridisierung während oder nach der Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgt.
13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die spezifische Hybridisierung und deren Detektion in der Echtzeit-PCR, bevorzugt im LightCycler<sup>TM</sup>-System erfolgt.
14. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Detektion der spezifischen Hybridisierung mittels Fluoreszenznachweis durchgeführt wird und wobei die markierten Hybridisierungssonden-Paare als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer(FRET)-Paar ausgebildet sind.
15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das klinische Material ausgewählt ist aus der Gruppe klinischer Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut und Biopsien.
16. Oligonucleotid-Primerpaar, zur Amplifikation eines DNA-Fragments der *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Gens, umfassend Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6 / SEQ ID NO: 7.
17. Oligonucleotid-Primerpaar, zur Amplifikation eines DNA-Fragments des *oxyR*-Gens spezifisch für bovine Mykobakterien, umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 12.
18. Oligonucleotid-Primer, zur Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments enthaltend RD1 flankierende Regionen des Mykobakteriengenoms, umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 und/oder SEQ ID NO: 17.



19. Oligonucleotid, welches mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons spezifisch hybridisiert umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 9 oder die komplementäre Sequenz davon.
20. Oligonucleotid, welches mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons spezifisch hybridisiert umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 10 oder die komplementäre Sequenz davon.
21. Oligonucleotid-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 9 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.
22. Oligonucleotid-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 10 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.
23. Oligonucleotid-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 13 / SEQ ID NO: 14 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.
24. Oligonucleotid-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 19 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.
25. Kit zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* umfassend
  - a) mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 6 / SEQ ID NO: 7, und

- b) mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 9 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon und/oder mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 8 / SEQ ID NO: 10 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.

26. Kit nach vorherigem Anspruch zusätzlich umfassend

- c) mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 3 und/oder mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 / SEQ ID NO: 3 und
- d) mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.

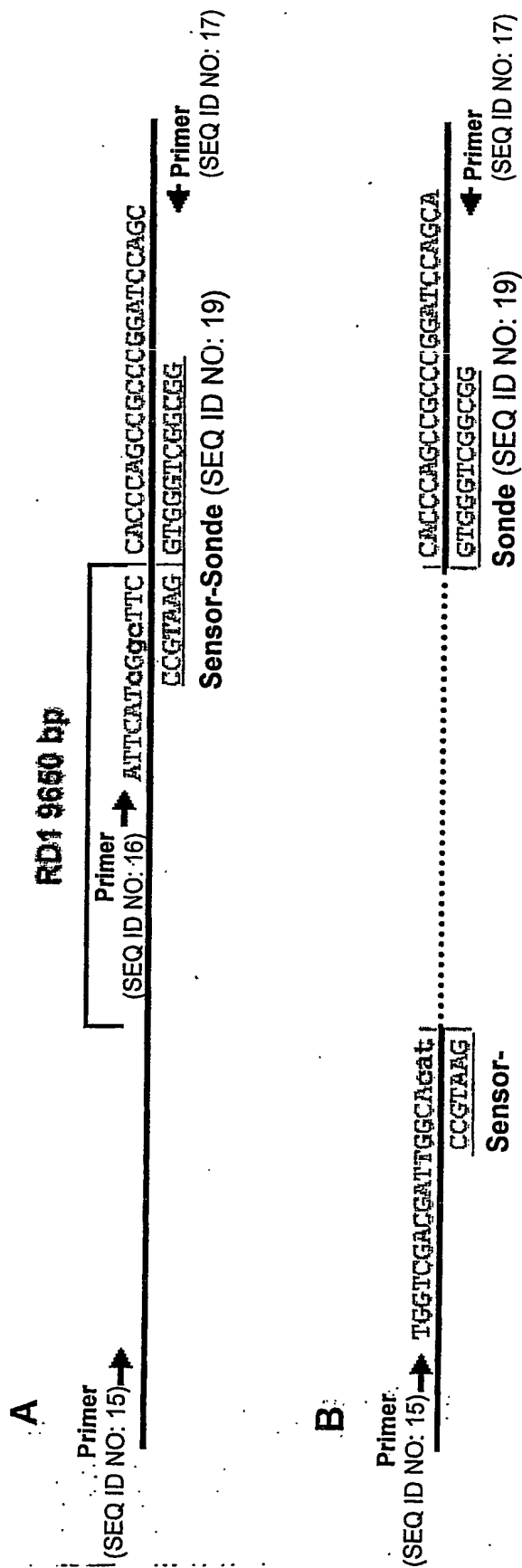
27. Kit zum gemeinsamen und spezifischen Nachweis von *M. bovis* und/oder *M. bovis* BCG umfassend

- a) mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 11 / SEQ ID NO: 12,
- b) mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 13 / SEQ ID NO: 14 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon,
- c) mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 15 / SEQ ID NO: 17 und/oder mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 16 / SEQ ID NO: 17 und

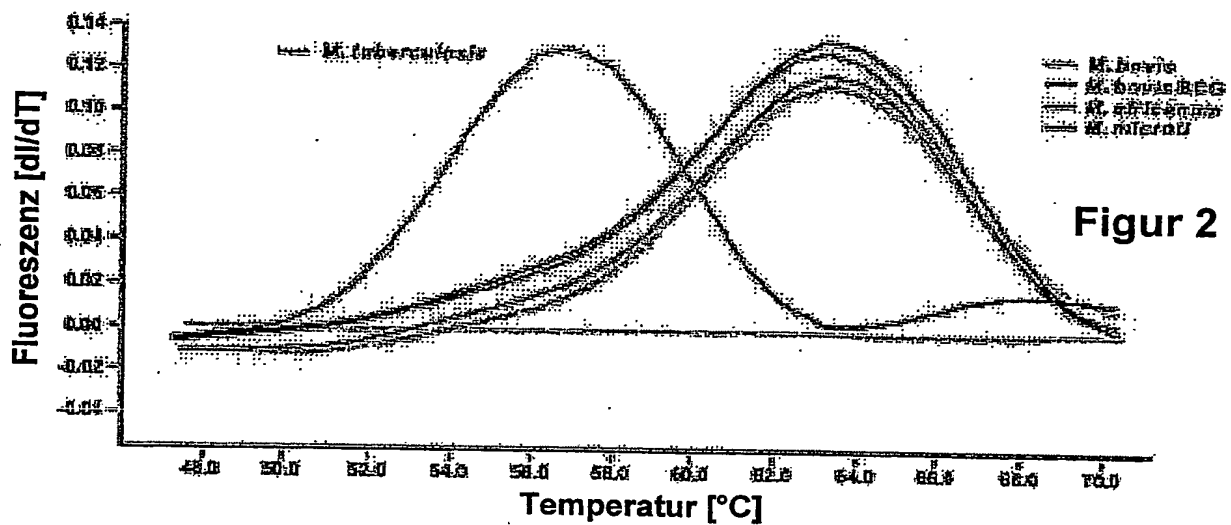
- d) mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 19 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.
28. Verwendung mindestens eines *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus in der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien, enthaltend die Nucleinsäuresequenz dargestellt in SEQ ID NO: 10 oder die komplementäre Sequenz davon, zum spezifischen Nachweis einer Infektion mit *M. tuberculosis*.

**Zusammenfassung**

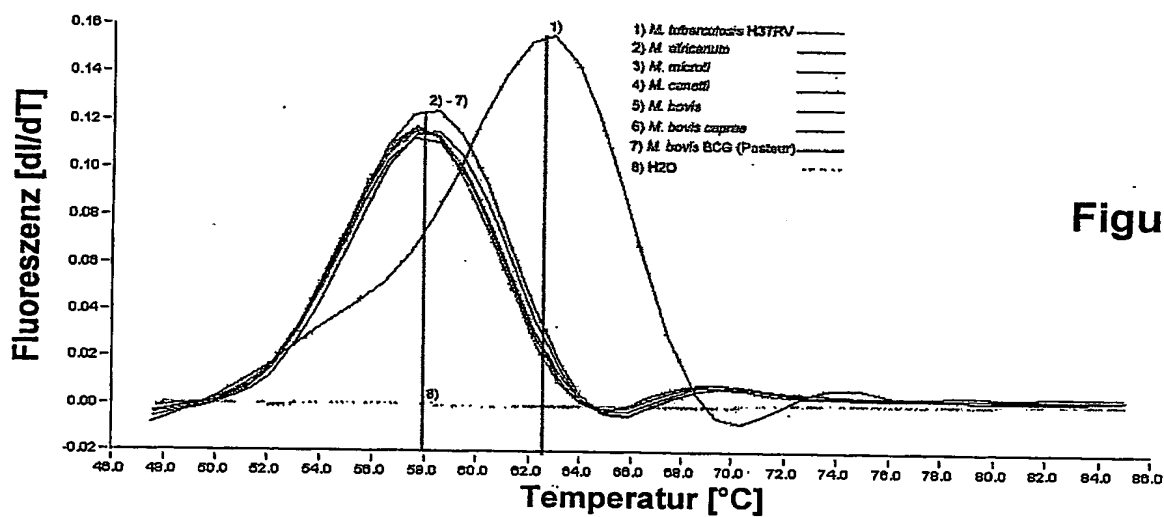
Verfahren und Mittel zum spezifischen Nachweis von Mykobakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (TBC), insbesondere *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG in klinischem Material.



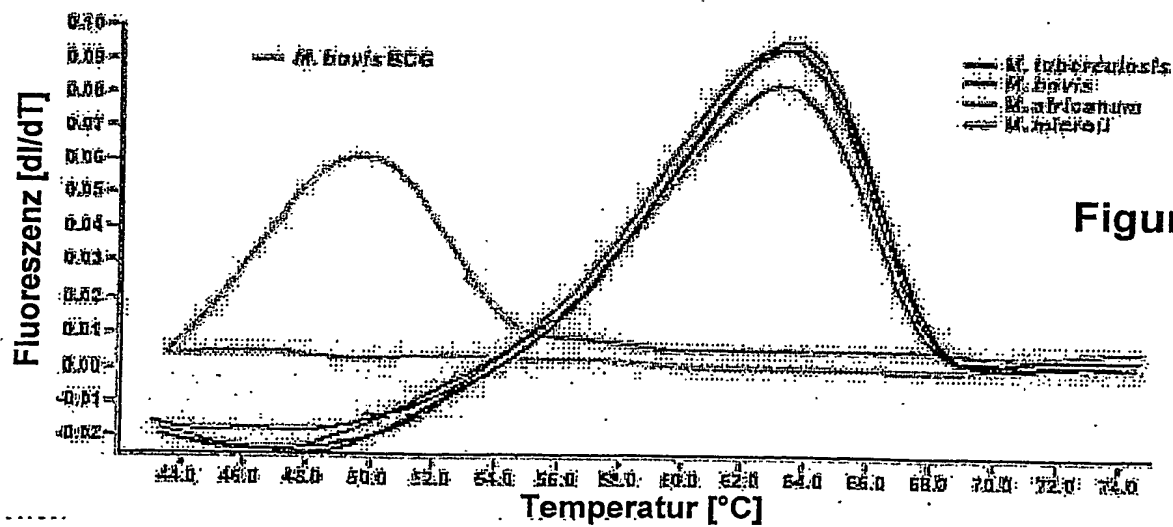
**Figur 1**



Figur 2



Figur 3



Figur 4

# SEQUENCE LISTING

<110> Bange, Franz Ch.

<120> Spezifischer Nachweis von Mykobakterien des M. tuberculo  
sis-Komplex

(Specific Detection of Mycobacteria of M. tub.-Complex)

<130> 18091

<160> 19

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 1

gagtttgatc ctggctcagg a  
21

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 2

ggcggagcat gtggatta  
18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 3

tgcacacagg ccacaagga  
20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 4  
gcaacgcgaa gaaccttacc tgg  
23

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 5  
tttgacatgc acaggacg  
18

<210> 6  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 6  
aaccgacggg gtgggtgac  
19

<210> 7  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 7  
atctcgatgg atgggcgtc  
19

<210> 8  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 8  
gtcgccacgc gtccagaaaa cc  
22



<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 9  
cgtgatcgct acgggcat  
18

<210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 10  
cgtaatcgct acgggcatg  
19

<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 11  
cgggtgccgc tgaccgcg  
18

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 12  
ccagccggct tcgcgtgg  
18

<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 13  
gccggtcacg cactgcacga cg  
22

<210> 14  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 14  
ggccagccac accgc  
15

<210> 15  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 15  
ctagacgagg ccgctcaag  
19

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 16  
agacgtggc ctttctgctg  
20

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 17  
acgggttact gcgaataaccg  
20

<210> 18  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 18  
gctatgccag acagatgctg gatc  
24

<210> 19  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium

<400> 19  
ggcggctggg tggaatgcc  
19

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**